

مطالعه آپوپتوز در بافت بیضه متعاقب ایجاد نهان بیضگی یک طرفه در موش صحرایی بالغ

سید اسماعیل صفوی^۱، میرهادی خیاط‌نوری^{۲*}، رسول شهرور^۳

خلاصه

سابقه و هدف: نهان بیضگی (کریپتور کیدیسم) به دنبال نقص در پایین آمدن بیضه‌ها به داخل کیسه بیضه در زمان تولد ایجاد می‌شود و یکی از علل ناباروری در انسان و بسیاری از گونه‌های حیوانی است. در گونه‌های مختلف پستانداران درجه حرارت بیضه پایین‌تر از حرارت فضای بطنی می‌باشد و نشان داده‌اند که این دمای پایین برای روند اسپرم‌سازی ضروری می‌باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی آپوپتوز پس از نهان بیضگی تجربی یک طرفه در موش صحرایی بالغ در بافت بیضه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، موش‌های صحرایی بالغ نژاد ویستار (۲۰۰-۲۵۰ گرم) به ۱۵ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. با ثابت کردن بیضه‌های راست به دیواره شکم، در هفت گروه نهان بیضگی تجربی یک طرفه ایجاد گردید. در گروه‌های اول تا هفتم به ترتیب ۱، ۳، ۶، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز پس از عمل، حیوانات کالبد گشایی شده و بیضه آنها مورد مطالعه قرار گرفت. در گروه هشتم تا چهاردهم به عنوان گروه برش، بیضه‌ها از کیسه بیضه به داخل محوطه بطنی جا به جا شده و سپس به کیسه بیضه بازگردانده شدند. در گروه پانزدهم به شم پس از برش، بیضه‌ها از کیسه بیضه به داخل محوطه بطنی جا به جا شده و سپس به کیسه بیضه بازگردانده شدند. در گروه پانزدهم به عنوان گروه شاهد هیچ گونه عملی صورت نگرفت. پس از نمونه‌برداری از بافت بیضه و ثبوت در فرمالین ۱۰ درصد نمکی، پاساژ بافتی و تهیه مقاطع بافتی و رنگ‌آمیزی با روش تائل، بیضه‌ها از نظر آپوپتوز در گروه‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج: رنگ آمیزی تائل مشخص ساخت که نهان بیضگی تجربی موجب القای آپوپتوز در سلول‌های زایای بافت بیضه می‌شود. اوج سلول‌های آپوپتوزیک در روزهای سوم و ششم پس از عمل مشاهده شد. اختلاف معنی‌داری مابین گروه شم و گروه شاهد وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه ما نشان داد که نهان بیضگی تجربی موجب القای آپوپتوز در بافت بیضه می‌شود و حداقل مرگ سلولی بعد از سه روز از عمل نهان بیضگی تجربی بوده و به تدریج با گذشت زمان نسبت به روز سوم کاهش مرگ سلولی مشاهده می‌شود. این اثر احتمالاً به دلیل تنفس حرارتی و تنش اکسیداتیو در سلول‌های بافت بیضه است.

واژگان کلیدی: کریپتور کیدیسم، آپوپتوز، بیضه، موش صحرایی بالغ

۱- استادیار گروه علوم تشریع دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز

۲- استادیار گروه فیزیولوژی - فارماکولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز

۳- دانشیار گروه علوم تشریع دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

* نویسنده مسؤول: میرهادی خیاط‌نوری

آدرس: گروه فیزیولوژی - فارماکولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز

پست الکترونیک: khayat_nouri@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۴ ۳۰۰ ۵۸۵۵

دورنویس: ۰۴۱۱ ۶۳۷۳۹۳۵

تاریخ دریافت: ۸۷/۲/۲

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۷/۸/۲۸

مشخص کرده که درجه‌ی حرارت کیسه بیضه در اغلب پستانداران ۴ تا ۵ درجه سانتی‌گراد از حرارت داخل فضای بطنی پایین‌تر است [۲]. اختلال در روند اسپرم‌سازی متعاقب نهان بیضگی، به دنبال قرار گرفتن بیضه‌ها در درجه حرارت بالا در محوطه بطنی ایجاد می‌شود. گزارش کرده‌اند که با سرد کردن بیضه‌ها در داخل محوطه بطنی حیوانات، اسپرم‌سازی طبیعی حاصل می‌شود [۳]. مطالعات فراوانی در مورد اثرات نهان بیضگی تجربی بر روی اسپرم‌سازی در حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفته است [۴، ۵].

مقدمه

نهان بیضگی (کریپتور کیدیسم) به دنبال نقص در پایین آمدن بیضه‌ها به داخل کیسه بیضه در زمان تولد حاصل می‌شود و یکی از علل ناباروری در انسان و بسیاری از گونه‌های حیوانی می‌باشد. در ۳ تا ۸ درصد مردان نابارور و در ۲۰ درصد مردان با فقدان اسپرم (آزواسپرمی)، عامل ایجاد کننده، نهان بیضگی بوده است [۱]. در گونه‌های مختلف پستانداران درجه حرارت نسبتاً پایین برای روند طبیعی اسپرم‌سازی مورد نیاز است. مطالعات

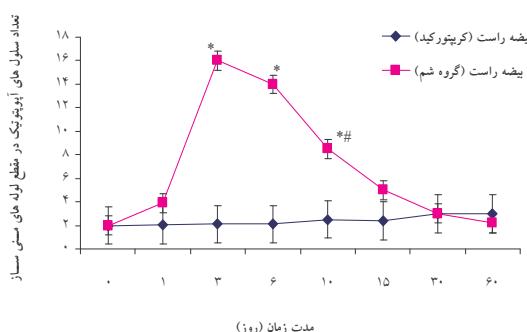
جلوگیری از بازگشت بیضه به کیسه بیضه، گوبرناکولوم قطع گردید. روی بیضه چپ هیچ گونه عملی صورت نگرفت. سپس عضلات دیواره‌ی بطی بخاطه استفاده از نخ بخیه کات گوت سه صفر، به صورت سرتاسری، و پوست با استفاده از نخ بخیه سیلک شماره سه صفر، به صورت تشكی افقی بخیه زده شد. در گروه شم پس از بیهوشی و ایجاد برش، بیضه‌ها داخل محوطه بطی کشیده و دوباره به داخل کیسه بیضه بازگردانده شده و عضلات و پوست به روش قبلی بخیه زده شد. در گروه شاهد هیچ گونه عملی روی حیوان صورت نگرفت. موش‌های صحرایی بالغی که تحت عمل نهان بیضگی تجربی یک‌طرفه قرار گرفتند به ۱۵ گروه هشت‌تایی تقسیم شدند، به طوری که ۷ گروه تحت عمل جراحی نهان بیضگی یک‌طرفه، ۷ گروه به عنوان گروه شم و یک گروه شاهد در نظر گرفته شد. حیوانات گروه‌های اول تا هفتم به ترتیب ۱، ۳، ۶، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز پس از عمل جراحی کالبدگشایی شده و نمونه‌های بیضه برای تهیی مقاطع هیستولوژیک به محلول فرمالین نمکی ۱۰ درصد متقل گردید. پس از فیکس شدن، مراحل مختلف پاپاژ بافت بر روی نمونه‌ها انجام شده و پس از قالب‌گیری با پارافین از آنها مقاطع پی در پی با ضخامت ۳ میکرومتر تهیی گردید. مقاطع مذکور به روش تابل با استفاده از کیت استاندارد شرکت رُش - آلمان و طبق روش کارخانه سازنده کیت، رنگ‌آمیزی گردیدند. همچنین برای رنگ‌آمیزی زمینه بافت، از روش تولوئیدین بلو استفاده شد. در ادامه سلول‌های آپوپتویک که به رنگ قهوه‌ای مشاهده می‌شدند در بافت بیضه مورد مطالعه قرار گرفتند، از میان مقاطع عرضی لوله‌های منی‌ساز، ۲۰ لوله به صورت تصادفی انتخاب شده و میانگین تعداد سلول‌های آپوپتویک در آنها ثبت گردید. در این مطالعه همچنین جهت شمارش تعداد سلول‌های زیایی لوله‌های منی‌ساز، پس از تهیی مقاطع بافتی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اوزین (شرکت مرک - آلمان) با استفاده از عدسی چشمی مشبك ۱۰ \times نمونه نیکون، تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتوگونی به صورت تصادفی در پنج ناحیه مختلف در سطح یک میلی‌متر مریع دیواره لوله منی‌ساز شمارش گردید. عدسی مشبك از یک مریع بزرگ که خود نیز از ۲۵ مریع کوچک و هماندازه (۵ ردیف افقی و ۵ ردیف عمودی) تشکیل شده است که مساحت مریع بزرگ یک میلی‌متر مریع می‌باشد. بعد از انجام آزمایش، نخست داده‌ها از نظر نرمالیتی توسط آزمون کولموگراف اسپیرنوف بررسی شد. سپس به صورت انحراف معیار \pm میانگین معیار بیان شده و برای مقایسه گروه‌های مختلف از تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن آزمون‌های مقایسه‌ای چندگانه توکی و برای مقایسه دو به دوی

[۴]. در تمامی مطالعات انجام شده ارتباط نسبی بین وسعت فعالیت ضداسپرم‌سازی و طول دوره‌ی نهان بیضگی بیان شده است، بنابراین برای بیان بهتر اثرات نهان بیضگی روی بافت بیضه و درک بهتر پاتوفیزیولوژی صدمات وارد، مهمترین راه بررسی تاثیر نهان بیضگی روی بافت بیضه می‌باشد. هر چند مطالعات فراوانی در مورد اثرات ضداسپرم‌سازی و مورفوپاتولوژی نهان بیضگی در بافت بیضه انجام شده، ولی علل کاهش تولید اسپرم تحت شرایط فوق مورد بحث می‌باشد. مطالعات بافت‌شناسی در بیضه و اپی‌دیدیم به دنبال ایجاد نهان بیضگی تجربی هم در موش‌های صحرایی بالغ [۸] و هم در موش‌های صحرایی نابالغ [۹، ۱۰] صورت گرفته است. با توجه به این که عمدتاً مطالعات انجام گرفته قبلی بیشتر در زمینه تغییرات بافتی بر پایه رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - اوزین صورت گرفته است و اطلاعات محدودی در مورد پدیده آپوپتوز در سلول‌های رده‌ی اسپرم‌سازی متعاقب نهان بیضگی تجربی وجود دارد، تحقیق در این مورد امری ضروری به نظر می‌رسد. از طرف دیگر اگر چه مشابه این کار قبل از صورت گرفته است ولی تعداد این مطالعات سیار کم و محدود بوده و در این آزمایش نیز از تعداد بیشتری نمونه و به مدت طولانی تری نسبت به مطالعات قبلی استفاده شده است. در این مطالعه جهت دست‌یابی دقیق تر و کامل تر به جزئیات تغییرات بافتی حاصله در بیضه و اختلالات روند اسپرم‌سازی به دنبال ایجاد نهان بیضگی تجربی در موش صحرایی بالغ، تغییرات آپوپتویک سلول‌های رده‌ی اسپرم‌سازی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی موش‌های صحرایی نر بالغ (۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم) نژاد ویستار، از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی خریداری شده و تحت شرایط ۱۲ ساعت روشناهی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای 25 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. غذا و آب به صورت آزاد در دسترس حیوانات قرار گرفت. برای ایجاد نهان بیضگی تجربی نخست از داروی رامپون با دوز ۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به عنوان داروی بیش‌بیهوشی و پس از ده دقیقه با تزریق داخل صفاقی داروی کتابین با دوز ۹۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بیهوشی کامل و عمیق حاصل گردید. سپس با ایجاد یک برش طولی روی خط میانی شکم، پوست و عضلات دیواره‌ی بطی و صفاق برش داده شد. بیضه‌ی راست از ناحیه‌ی کیسه بیضه به داخل محوطه بطی کشیده شد. با استفاده از نخ بخیه شماره چهار صفر نایلونی، بیضه از ناحیه‌ی دمی به دیواره‌ی عضلانی محوطه بطی بخیه زده شده و برای

معنی داری وجود ندارد، بنابراین اعداد مربوط به گروه شاهد ذکر نشده است. یک روز پس از ایجاد نهان بیضگی تجربی، میانگین تعداد سلول‌های آپوپتویک در بیضه راست (داخل شکمی) برابر $۳/۸۵\pm ۰/۱۶$ بود که در مقایسه با گروه شم یک روزه ($۲/۷\pm ۰/۱۵$) اختلاف معنی داری وجود نداشت. روز سوم پس از عمل، تعداد سلول‌های آپوپتویک در مقایسه با سایر گروه‌ها به حداقل میزان خود رسید و در بیضه کرپیتور کید به تعداد $۱۶/۴۳\pm ۰/۳۴$ رسید که در مقایسه با گروه شم مشابه افزایش معنی دار ($p=۰/۰۰۱$) نشان داد. در روز ۶ پس از عمل تعداد سلول‌های آپوپتویک $۱۳/۹۳\pm ۰/۵۱$ بود که در مقایسه با گروه شم ۶ روزه افزایش معنی دار ($p=۰/۰۰۷$) نشان داد. در روز دهم پس از عمل تعداد سلول‌های آپوپتویک $۷/۹۵\pm ۰/۳۶$ بود، هر چند در مقایسه با گروه قبل (۶ روزه) کاهش معنی دار داشت ($p=۰/۰۱۶$) ولی در مقایسه با گروه شم مشابه افزایش معنی دار ($p=۰/۰۲۲$) نشان داد. در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ پس از عمل کاهش سلول‌های آپوپتویک $۳/۸۲\pm ۰/۰۲$ مشاهده گردید و به ترتیب تعداد سلول‌های آپوپتویک $۲/۳۲\pm ۰/۱۹$ و $۳/۳۳\pm ۰/۱۶$ بود که در مقایسه با گروه شم تفاوت معنی داری مشاهده نشد (نمودار شماره ۱).



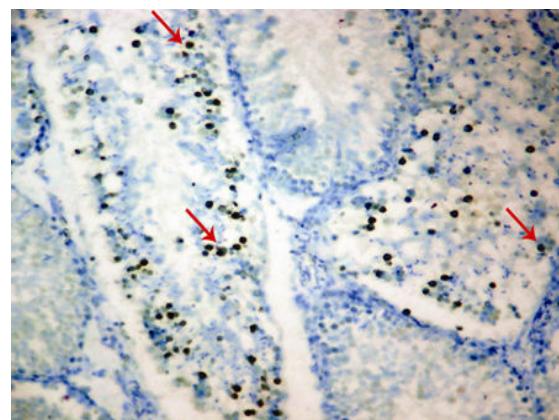
نمودار ۱- میانگین تعداد سلول‌های آپوپتویک در مقطع لوله‌های منی‌ساز در زمان‌های مختلف پس از عمل نهان بیضگی. $*p<0/۰۵$ در مقایسه با گروه شم و $#p<0/۰۵$ در مقایسه با گروه روز ۳ و ۶ هستند.

آنالیز آماری تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه در بیضه راست کرپیتور کید نشان داد که در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ پس از عمل نهان بیضگی، در مقایسه با گروه شم مشابه کاهش معنی دار (مقدار p به ترتیب برای روزهای ذکر شده برابر با $۰/۰۰۰۳$ ، $۰/۰۰۰۱$ و $۰/۰۰۰۱$ می‌باشد) وجود دارد. همچنین تجزیه و تحلیل آماری تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در بیضه‌های کرپیتور کید در روزهای ۳۰ و ۶۰ پس از عمل در مقایسه با گروه شم مشابه کاهش معنی دار (مقدار p برای روز ۳۰ برابر $۰/۰۴۳$ و برای روز ۶۰ برابر با $۰/۰۰۴$ بود) نشان داد ولی در روز ۱۵ این

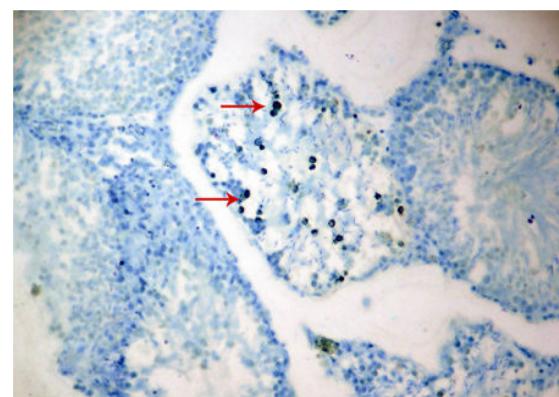
گروه شم و کرپیتور کید در روزهای یکسان از آزمون تی غیر وابسته جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده گردید. مقدار $<0/۰۵$ برای تعیین سطح معنی داری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

مطالعه مقاطع بافتی گروه‌های مختلف نشان داد که آپوپتوز در سلول‌های زایای بافت بیضه و عمدتاً در سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه مشاهده می‌شود. تعداد سلول‌های آپوپتویک در مقاطع تعدادی از لوله‌های منی‌ساز، بیشتر از لوله‌های دیگر مشاهده گردید (شکل شماره ۱ و ۲).



شکل ۱- مقطع بافت بیضه در روز سوم پس از عمل. تعداد زیادی سلول‌های آپوپتویک به رنگ قهوه‌ای تیره در دیواره لوله‌های منی‌ساز دیده می‌شود (↗). در برخی از لوله‌ها سلول‌های آپوپتویک به مقدار کمتر مشاهده می‌شود. رنگ‌آمیزی تانل. درشت‌نمایی $\times 100$.



شکل ۲- مقطع بافت بیضه در روز ششم پس از عمل. تعدادی سلول آپوپتویک به رنگ قهوه‌ای تیره در دیواره لوله‌های منی‌ساز دیده می‌شود (↗). در برخی از لوله‌ها سلول‌های آپوپتویک به مقدار کمتر مشاهده می‌شود. رنگ‌آمیزی تانل. درشت‌نمایی $\times 100$.

تجزیه و تحلیل آماری سلول‌های آپوپتویک در گروه‌های مختلف آزمایشی نشان داد که بین گروه شاهد و گروه شم اختلاف

شروع به شکستن می‌کنند، که به این حالت اصطلاحاً فرآگماناتیسیون داخل نوکلئوزومی گفته می‌شود [۱۴]. علاوه بر موارد ذکر شده ساز و کارهای دیگری باعث بروز تغییرات کروماتینی در هسته‌ی سلول می‌شود. غیرفعال شدن آنزیم‌هایی که در تعییر DNA نقش دارند یکی از این موارد است. پلی‌آدنوزین دی‌فسفات پلیمراز (PADP) اولین پروتئین است که در آسیب‌DNA می‌شود. آنزیم کاسپاز ۳ که به دنبال آپوپتوز فعال می‌گردد، با شکستن آنزیم PADP عملکرد آن را در تعییر DNA از بنی می‌برد [۱۵]. تغییرات آپوپتویک به دنبال ایجاد تنش حرارتی منحصراً مرتبط با تغییرات هسته سلول‌های آپوپتویک نبوده و میتوکندری‌ها نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرند. در میتوکندری سلول‌های آپوپتویک، اختلال در پتانسیل انتقال و نفوذپذیری لایه داخلی غشای قابل تشخیص است، طوری که این لایه توانایی جلوگیری از نشت برخی ملکول‌ها را از دست می‌دهد [۱۶]. پروتئین P53 مرتبط با پوشش هسته بوده و در زمان تنش حرارتی، به داخل هسته منتقل می‌گردد و توقف چرخه‌ی سلولی و یا خودکشی سلولی با واسطه P53 رخ می‌دهد [۱۶]. مطالعات انجام شده توسط پژوهشگران بیانگر وجود میزان فراوان پروتئین P53 در سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه می‌باشد که به دلیل تشکیل DNA در مرحله پیش میبوزی است. بنابراین آسیب‌های DNA به دنبال نهان بیضگی و ایجاد تنش حرارتی در سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه از حساسیت بالاتری برخوردار است [۱۷]. در مطالعه‌ی حاضر نیز پس از ایجاد نهان بیضگی تجربی، یافته‌ها حاکی از تایید مطلب فوق بوده و اکثر سلول‌های آپوپتویک در اسپرماتوسیت‌های اولیه مشاهده می‌شود. در یک بررسی انجام شده بر روی سلول‌های زایا، پس از نهان بیضگی تجربی نتایج مشابهی حاصل گردید و عمدتاً سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه تحت تاثیر تنش حرارتی دچار آپوپتوز شدند [۱۸]. نهان بیضگی تجربی در موش‌های صحرایی بالغ منجر به افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها و غیرفعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود. پراکسیداسیون چربی‌ها و ایجاد رادیکال‌های آزاد اضافی، می‌تواند موجب آسیب پروتئین‌ها و DNA و القای آپوپتوز در سلول‌های بافت بیضه گردد [۱۹]. در یک بررسی انجام شده در موش صحرایی، نهان بیضگی تجربی منجر به افزایش پراکسیداسیون چربی‌های سلولی گردید که به عنوان نشانه‌ای از بروز تنش اکسیداتیو می‌باشد. رادیکال‌های آزاد در طی متabolism طبیعی سلول‌های بدن تولید می‌شوند و تولید رادیکال‌های آزاد بیش از ظرفیت تدافعی آنتی-

کاهش معنی‌دار نبود. بین گروه شاهد و شم در روزهای مختلف تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد (جدول شماره‌ی ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین تعداد سلول‌های اپیتلیوم لوله منی‌ساز پس از ایجاد نهان بیضگی تجربی یک‌طرفه در موش صحرایی بالغ (میلی-متر مربع).

گروه	اسپرماتوسیت اویله	اسپرماتوغونی
بیضه راست (گروه شاهد)	۵۷۰/۵۲±۲۳/۰۳	۶۴۵/۵۱±۶/۶۲
بیضه راست شم (روز ۱)	۵۹۱/۲۵±۱۳/۷۶	۶۲۹/۸۷±۱۱/۶۷
بیضه راست شم (روز ۳)	۶۱۲/۱۲±۱۴/۰۱	۵۹۹/۲۲±۱۶/۶۴
بیضه راست شم (روز ۶)	۵۸۷±۱۲/۵۲	۶۶۲/۲۵±۱۱/۷۳
بیضه راست شم (روز ۱۰)	۵۸۳±۲۴/۳۹	۶۴۱/۳۷±۱۵/۰۶
بیضه راست شم (روز ۱۵)	۵۶۶/۲۵±۱۷/۸۵	۶۵۸/۱۲±۲۵/۷۷
بیضه راست شم (روز ۳۰)	۵۹۵/۳۷±۲۴/۶۸	۶۲۸/۹۹±۱۷/۶۵
بیضه راست شم (روز ۶۰)	۶۰۷/۷۵±۱۸/۲۵	۶۱۳/۳۴±۱۱/۷۴
بیضه راست کرپیتورکید (روز ۱)	۵۷۳/۴±۱۷/۰۳	۶۳۵/۴±۱۱/۶۷
بیضه راست کرپیتورکید (روز ۳)	۵۶۸/۲±۱۴/۱۷	۶۴۰/۲±۱۶/۶۴
بیضه راست کرپیتورکید (روز ۶)	۵۷۱/۴±۱۴/۰۳	۵۹۰/۲۵±۸/۹۸
بیضه راست کرپیتورکید (روز ۱۰)	۵۵۸/۱۷±۱۲/۵۹	۵۳۵/۳±۲۳/۴۸
بیضه راست کرپیتورکید (روز ۱۵)	۵۲۲/۱۲±۱۴/۰۱	۴۹۵/۸±۱۶/۶۴
بیضه راست کرپیتورکید (روز ۳۰)	۲۲۴/۶۲±۲۲/۴۷	۱۹۱/۲۵±۱۶/۳۸
بیضه راست کرپیتورکید (روز ۶۰)	۱۹۳/۳۷±۲۶/۵۲	۸۲/۸۷±۸/۹۸

*: $p < 0.05$ در مقایسه با گروه شم مشابه در هر ستون می‌باشد.

بحث

مطالعات فراوانی بر روی بافت بیضه به ویژه بر روی سلول‌های رده‌ی اسپرم‌سازی چه در افرادی که دچار عارضه نهان بیضگی بوده و چه پس از ایجاد تجربی آن به روشن جراحی، در انسان و حیوانات مختلف صورت گرفته است [۱۲، ۱۱، ۵]. مطالعات فراوانی نیز در حیوانات آزمایشگاهی نظیر موش صحرایی [۷]، موش سوری [۱۳] و هامستر طلایی [۶] صورت گرفته که همگی نشانگر اختلالات پیش‌رونده در بافت بیضه و روند اسپرم‌سازی متناسب با افزایش مدت زمان پس از عمل نهان بیضگی بوده است. در مطالعه‌ی حاضر، مرگ بزنده‌دار سلولی یا آپوپتوز در سلول‌های زایای بافت بیضه پس از ایجاد نهان بیضگی تجربی مورد بررسی قرار گرفت. به دنبال ایجاد تنش حرارتی فعالیت آنزیم‌های آندونوکلئاز موجب تخریب DNA می‌گردد. در طی این روند DNA تحت الگوی بسیار ویژه به قطعاتی با طول ۱۸۰-۲۰۰ جفت باز شکسته می‌شود که این قسمت‌ها در حقیقت طولی از DNA است که به دور هیستون‌ها در نوکلئوزوم پیچیده می‌شود. به عبارت دیگر DNA در نواحی اتصالی ما بین نوکلئوزوم‌ها

ها با اتصال به پروتئین P53 باعث احتباس آن در سیتوپلاسم سلول‌های زایا شده و از اتصال به جایگاه هسته‌ای ممانعت می‌کنند و بدین ترتیب از ایجاد آپوپتوz جلوگیری می‌کنند. میزان ظهرور این پروتئین‌ها در مراحل نخستین شوک حرارتی افزایش مشخصی ندارند و در جلوگیری از بروز آپوپتوz نقش چندانی نداشته و زمانی که در مراحل بعدی شاخص سلول‌های آپوپتویک بالا می‌رود، پروتئین‌های شوک حرارتی فعال می‌شوند [۲۳]. این مطلب می‌تواند کاهش تدریجی سلول‌های زایای آپوپتویک با افزایش مدت زمان پس از عمل کریپتورکیدیسم تجربی را توجیه نماید. همچنین پس از افزایش سریع سلول‌های آپوپتویک در روز سوم، فعالیت سلول‌های فاگوسیت‌کننده می‌تواند موجب کاهش جمعیت سلول‌های آپوپتویک گردد. سلول‌های آپوپتویک به علت آشکار شدن سیگنال‌هایی در سطح خود سریعاً توسط سلول‌های فاگوسیت‌کننده، تشخیص داده می‌شوند. مشخص شده که سلول‌های سرتولی قابلیت فاگوسیت کردن سلول‌های آپوپتویک را دارند [۲۴]. در تحقیق حاضر نیز نتایج مطالعه ما نشان داد که تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتوگونی به ترتیب پس از روزهای پانزدهم و سی ام بعد از عمل به صورت معنی‌دار کاهش می‌یابد که این امر می‌تواند به دلیل فاگوسیته شدن سلول‌های آپوپتویک توسط سلول‌های سرتولی و سایر سلول‌های بیگانه‌خوار باشد. علت کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتوگونی در روزهای متفاوت به دلیل مقاوم بودن سلول‌های اسپرماتوگونی به پدیده آپوپتوz نسبت به سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه می‌باشد [۱۷]. مشاهدات ما نشان داد که آپوپتوz عمدها در سلول‌های اسپرماتوگونی ایجاد می‌شود. نشان داده شده که اسپرماتوگونی‌ها در برابر آپوپتوz حاصل از نهان بیضگی مقاوم هستند [۱۷]. در پاسخ به شوک حرارتی علاوه بر HSP، عامل دیگری به نام عامل ترانس کریپشن شوک حرارتی یا HSF در سلول‌های زایای بافت بیضه تولید می‌شود. HSF موجب تغییر آپوپتوz در سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه می‌شود، در حالی که در مورد سلول‌های اسپرماتوگونی به عنوان یک عامل حیات‌بخش عمل می‌کند [۲۵]. به نظر می‌رسد دو نقش متقضاد HSF در مورد سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه مرتبط با فعالیت پروتئین P53 باشد. در پاسخ به نشان حرارتی، HSF موجب تحریک فعالیت P53 می‌شود و با توجه به اینکه سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه میزان فراوانی P53 را در خود دارند و سلول‌های اسپرماتوگونی مقدار کمتری P53 دارند، بنابراین نقش HSF در سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه، تحریک آپوپتوz و در سلول‌های

اکسیدان‌ها، موجب بروز نش آکسیداتیو و پاسخ‌های غیرقابل برگشت مانند آپوپتوz یا نکروز در سلول‌های زنده می‌شود [۱۹]. آنزیم گزاتین اکسیداز که به طور وسیع در بافت‌های بدن به ویژه در آندوتیلیوم عروق کوچک دیده می‌شود باعث تبدیل هپیوگراتین به گزاتین و گزاتین به اسید اوریک می‌شود که به همراه آن سوپراکسیدها تولید می‌شوند. فعالیت این آنزیم در بیضه انسان و موش صحرایی تشخیص داده شده و به دلیل ایجاد آسیب‌های بیضوی القا شده به ویژه به دنبال ایسکمی بافتی مورد توجه قرار گرفته است [۲۰]. در یک بررسی با استفاده از مهارکننده‌های گزاتین اکسیداز (مثل آلوپورینول) در موش‌های صحرایی که تحت عمل نهان بیضگی تجربی قرار گرفته بودند، پژوهشگران دریافتند که آپوپتوz سلول‌های زایا به صورت معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد کاهش می‌یابد [۲۰]. بنابراین، مطالعات فوق مovid آن است که نش آکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد ممکن است در القای آپوپتوz تحت شرایط نش حرارتی نقش مهمی داشته باشند. نتایج حاصل از شمارش سلول‌های آپوپتویک پس از ایجاد نهان بیضگی تجربی یک طرفه در موش‌های بالغ در روزهای مختلف پس از عمل نشان داد که در روز اول پس از عمل، تغییر معنی‌داری در تعداد سلول‌های آپوپتویک در مقایسه با گروه شم ایجاد نگردید. در روز سوم پس از عمل تعداد سلول‌های آپوپتویک سریعاً افزایش یافته و در مقایسه با روز اول و گروه شم افزایش معنی‌داری نشان داد. نقطه‌ای اوج تعداد سلول‌های آپوپتویک در همان روز سوم بوده و روند کاهش تدریجی این سلول‌ها پس از روز سوم شروع شد. هر چند در روزهای ۶ و ۱۰ پس از عمل، در مقایسه با گروه شم افزایش معنی‌دار بود، ولی در مقایسه با روز سوم کاهش تدریجی نشان داد. نتایج بررسی و مطالعه انجام شده توسط Barqawi و همکاران (۲۰۰۴) روی آپوپتوz سلول‌های بافت بیضه پس از نهان بیضگی تجربی نشان داد که اوج تعداد سلول‌های آپوپتویک در روز چهارم پس از عمل بوده و پس از آن روند کاهش تدریجی سلول‌های آپوپتویک دیده می‌شود. همچنین آنها با بررسی اثرات نهان بیضگی تجربی روی سلول‌های زایای بافت بیضه موش صحرایی دریافتند که بین وسعت فعالیت آپوپتویک سلول‌های زایگر و طول دوره‌ی نهان بیضگی ارتباط وجود دارد [۱۸]. کاهش تدریجی سلول‌های آپوپتویک پس از سومین روز بعد عمل می‌تواند علل مختلفی داشته باشد و نقش پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) در این امر می‌تواند نقش داشته باشد. این پروتئین‌ها که تعدادی از آنها در سلول‌های زایای بافت بیضه شناسایی شده است، می‌توانند در جلوگیری از بروز آپوپتوz در سلول‌های زایا نقش داشته باشد [۲۰، ۲۱]. این پروتئین-

نتیجه گیری

به طور خلاصه نتایج این مطالعه نشان داد که نهان بیضگی تجربی باعث القای آپوپتوز و مرگ سلولی در سلولهای بافت بیضه موش صحرایی می‌شود و تعداد سلولهای آپوپتوتیک در روز سوم بعد از عمل نهان بیضگی در حداکثر میزان خود است و با گذشت زمان نسبت به روز سوم، به تدریج کاهش می‌یابد. علت بروز آپوپتوز احتمالاً ممکن است در ارتباط با تنفس حرارتی و تنفس اکسیداتیو باشد. البته نقش نهان بیضگی در القای آپوپتوز سلولهای بافت بیضه انسان نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

اسپرماتوگونی نقش ترمیم کنندگی DNA است [۲۵]. نتایج مطالعه-ی ما نشان داد که تعداد سلولهای آپوپتوتیک در برخی از لوله‌ها بیشتر از سایر لوله‌های منی‌ساز می‌باشد. نشان داده شده است که سیکل اسپرم‌سازی در لوله‌های منی‌ساز متغیر بوده و هم‌زمان تعدادی از لوله‌های منی‌ساز به صورت فعلی و تعدادی نیز غیرفعال می‌باشند [۲۶]. با توجه به اینکه بیشتر سلولهای اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتیدها تحت تاثیر پدیده آپوپتوز قرار می‌گیرند [۱۷] پس در لوله‌هایی که سیکل اسپرم‌سازی آنها فعلی‌تر است، سلول‌های آپوپتوتیک نیز بیشتر دیده می‌شود.

References:

- [1] Montella A, Pirino A. Morphological findings in cryptorchism in the adult male. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1990;66(3):215-22.
- [2] Turner TT, D'addario DA, Forrest JB, Howards SS. The effects of experimental cryptorchidism on the entry of [³H]-inulin and [³H]-horseradish peroxidase into the lumen of the rat seminiferous tubules. *J Androl* 1982; 3(3):178-83.
- [3] Frankenhuys MT, Wensing CJ. Induction of spermatogenesis in the naturally cryptorchid pig. *Fertil Steril* 1979;31(4):428-33.
- [4] Gnay Y, Bulut HE, Onarlioglu B, Başimoglu-Koca Y. Comparison of the effects of vasectomy and experimental cryptorchidism in rats: I. Testicular histology. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1998;75(2-3):61-9.
- [5] Ren L, Medan MS, Ozu M, Li C, Watanabe G, Taya K. Effects of experimental cryptorchidism on sperm motility and testicular endocrinology in adult male rats. *J Reprod Dev* 2006;52(2):219-28.
- [6] Vigodner M, Lewin LM, Shochat L, Oschry I, Lotan G, Kleen B, et al. Evaluation of damage to the testicular cells of golden hamsters caused by experimental cryptorchidism using flow cytometry and confocal microscopy. *Int J Androl* 2003;26(2):84-90.
- [7] Gracia Romero J, Ferrández Longás A, Guallart Labrador A, Moros García M, Alvarez Alegret R, García Julián G. Experimental cryptorchidism in the Wistar rat. *Cir Pediatri* 1990;3(3):97-102.
- [8] Jones TM, Anderson W, Fang VS, Landau RL, Rosenfield RL. Experimental cryptorchidism in adult male rats: histological and hormonal sequelae. *Anat Rec* 1977;189(1):1-27.
- [9] Kerr JB, Rich KA, de Kretser DM. Effects of experimental cryptorchidism on the ultrastructure and function of the Sertoli cell and peritubular tissue of the rat testis. *Biol Reprod* 1979;21(4):823-38.
- [10] Quinn FM, Crockard AD, Brown S. Secondary changes in the scrotal testis in experimental unilateral cryptorchidism. *J Pediatr Surg* 1990;25(4):402-5.
- [11] Pinart E, Sancho S, Briz M, Bonet S. Morphologic study of the testes from spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchid boars. *J Morphol* 1999;239(3):225-43.
- [12] Rossi LM, Pereira LA, de Santis L, Pasqualotto FF, Iaconelli A Jr, Ortiz V, et al. Sperm retrieval techniques in rats with suppressed spermatogenesis by experimental cryptorchidism. *Hum Reprod* 2005;20(2):443-47.
- [13] Mendis-Handagama SM, Kerr JB, de Kretser DM. Experimental cryptorchidism in the adult mouse: I. Qualitative and quantitative light microscopic morphology. *J Androl* 1990;11(6):539-47.
- [14] Royere D, Guérif F, Laurent-Cadoret V, Hochereau de Reviers MT. Apoptosis in testicular germ cells. *Int Congr Ser* 2004;1266:170-76.
- [15] Yin Y, Hawkins KL, DeWolf WC, Morgentaler A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl* 1997;18(2):159-65.
- [16] Yin Y, DeWolf WC, Morgentaler A. Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and -independent pathways in mice. *Biol Reprod* 1998;58(2):492-96.
- [17] Yin Y, Stahl BC, DeWolf WC, Morgentaler A. P53 and Fas are sequential mechanisms of testicular germ cell apoptosis. *J Androl* 2002;23(1):64-70.
- [18] Barqawi A, Trummer H, Meacham R. Effect of prolonged cryptorchidism on germ cell apoptosis and testicular sperm count. *Asian J Androl* 2004;6:47-51.
- [19] Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, et al. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod* 1999;61(2):393-399.

- [20] Kumagai A, Kodama H, Kumagai J, Fukuda J, Kawamura K, Tanikawa H, et al. Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol Hum Reprod* 2002;8(2):118-23.
- [21] Sarge KD, Cullen KE. Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci* 1997;53(2):191-97.
- [22] Kumagai J, Fukuda J, Kodama H, Murata M, Kawamura K, Itoh H, et al. Germ cell-specific heat shock protein 105 binds to p53 in a temperature-sensitive manner in rat testis. *Eur J Biochem* 2000;267(10):3073-8.
- [23] Guo CX, Ma J, Zhou XC, Liu YX. Expression of HSP70-2 gene during germ cell apoptosis in rat unilateral cryptorchid testes. *Arch Androl* 2001;46(2):109-15.
- [24] Ohta Y, Nishikawa A, Fukazawa Y, Urushitani H, Matsuzawa A, Nishina Y, et al. Apoptosis in adult mouse testis induced by experimental cryptorchidism. *Acta Anat (Basel)* 1996;157(3):195-204.
- [25] Izu H, Inouye S, Fujimoto M, Shiraishi K, Naito K, Nakai A. Heat shock transcription factor 1 is involved in quality-control mechanisms in male germ cells. *Biol Reprod* 2004;70(1):18-24.
- [26] Dellmann HD, Eurell, JO Ann C, editors. Textbook of veterinary histology. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. p. 228-233.